

# 生体分子の局所固定化法の開発とその応用に関する研究

著者	梶 弘和
号	50
学位授与番号	3510
URL	<a href="http://hdl.handle.net/10097/37178">http://hdl.handle.net/10097/37178</a>

氏 名	かじ ひろかず 梶 弘和
授 与 学 位	博士 (工学)
学位授与年月日	平成 17 年 9 月 14 日
学位授与の根拠法規	学位規則第 4 条第 1 項
研究科, 専攻の名称	東北大学大学院工学研究科 (博士課程) バイオロボティクス専攻
学位論文題目	生体分子の局所固定化法の開発とその応用に関する研究
指 導 教 員	東北大学教授 西澤松彦
論文審査委員	主査 東北大学教授 西澤松彦      東北大学教授 佐藤正明 東北大学教授 桑野博喜

## 論文内容要旨

生体分子と材料表面が接する界面（バイオインターフェース）での現象の理解と制御は、バイオテクノロジーの多くの局面で非常に重要である。生体分子と材料表面の相互作用は、生体適合性に配慮した医用材料の表面処理など、従来から重要な検討課題であったが、昨今の組織工学やバイオチップ・デバイス工学の急速な進歩を受けて、バイオインターフェース研究の重要性が益々高まっている。その中で、生体分子を自在に操作し、機能を維持したまま基板上に配列固定（パターニング）する技術は、検出や解析の技術と並び、バイオインターフェース研究におけるキーテクノロジーの一つである。特に生体分子が乾燥や熱に対して脆弱であることに対応したパターニング技術の確立が望まれている。

本論文では、生体分子の脆弱性に配慮したパターニング技術の開発とその特長を利用した応用を追及した。以下に各章の概要を示す。

### 第 1 章 序論

バイオインターフェース研究におけるリソグラフィ技術の開発動向と問題点を考察し、本研究の背景および目的を示した。また、バイオリソグラフィ技術の応用例の一つである細胞培養環境の制御について概説し、生体分子の脆弱性に対応した技術開発の重要性を述べた。

### 第 2 章 実験

本研究全般で用いた電極、実験システム、基板の前処理法および細胞について詳細に記載した。

### 第 3 章 電気化学的手法を用いる生体分子の局所固定化（電気化学バイオリソグラフィ）

タンパク質や細胞などの生体分子のパターニング技術は、バイオインターフェースサイエンスの研究展開を支える重要な基盤技術である。半導体加工分野で培われたリソグラフィ技術は、コスト面で問題を抱えているものの、パターン寸法精度が高く、そこから派生した技術をバイオ分野に応用する検討が盛んに行われている。DNA チップの開発においては、半導体加工技術ベースのリソグラフィを転用することで、チップ基板上に DNA 分子を高密度に配置することに成功している。しかし、タンパク質や細胞は、DNA に比べ乾燥や酸化、熱に対する安定性が低く、DNA チップの作製に用いる方法論は通用しない。本章では、電気化学的手法を用いた擬似生理環境下におけるタンパク質および細胞のパターニング技術（電気化学バイオリソグラフィ）を開発した。

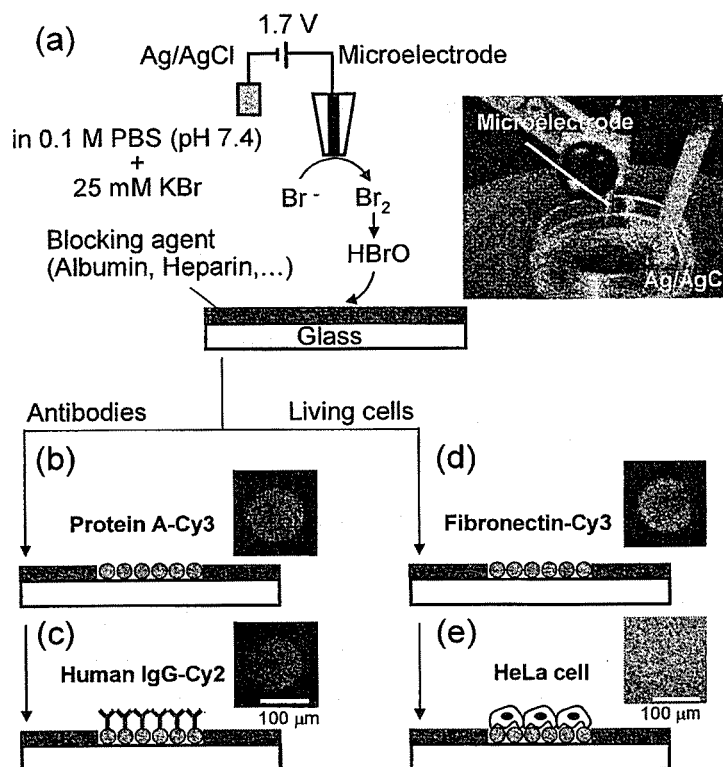
本技術は、アルブミンなどでブロッキング処理を施した基板の生体分子に対する吸着特性が、次亜臭素酸などの酸化剤によって非吸着性から吸着性へと瞬時に変換されるという独自に見出した現象に基づいている。Fig.1 に、電気化学バイオリソグラフィーを利用してタンパク質や細胞の吸着を局所的に誘導する手法の一例を示す。ブロッキング処理を施した基板表面近傍 (30  $\mu\text{m}$  上方) に配置した Pt マイクロディスク電極 (電極径, 10  $\mu\text{m}$ ) に、臭化物イオンを含むリン酸バッファー (pH 7.4) 中で酸化電位を印加して臭素を生成させる (Fig.1a)。この電解生成した臭素が水と反応して一部次亜臭素酸が生成され、基板表面が酸化雰囲気曝される。Fig.1b は、5 秒間の電位印加の後、基板を Cy3 で標識したプロテイン A 溶液 (25  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) に 30 分浸漬したものであるが、マイクロ電極の先端軸を中心とする円形にプロテイン A の吸着が認められる。プロテイン A はヒト、マウス、ウサギなどの IgG 抗体の Fc 領域と特異的に結合するため、プロテイン A を吸着させた後に抗体を固定することで、抗体の抗原結合部位を液相側に配向させることができる (Fig.1c)。また、フィブロネクチンなどの細胞外マトリックス (ECM) タンパク質を、電気化学的な処理を施した領域に吸着させた後に細胞培養に供することで、細胞接着を局所的に誘導することが可能である (Fig.1d,e)。

マイクロ電極で処理を施した領域にタンパク質が吸着するメカニズムを、一連の表面解析法を用いて検討したところ、酸化剤処理により大部分のアルブミン分子が基板から脱離し、下地の基板表面が露出した領域にタンパク質が吸着することが明らかになった。

パターンサイズを制御するパラメーターは、同じサイズの電極を用いた場合、酸化剤の電解時間、電極のスキャン速度および電極 - 基板間距離の 3 つであることが確認され、基板表面改質反応自体は速やかに進行し、電解生成した酸化剤の拡散が反応を律速していることが示された。さらに、酸化剤の拡散をデジタルシミュレーションすることで、サブ nM 程度の酸化剤濃度で表面改質反応が進行することが示唆された。

#### 第 4 章 多段階リソグラフィー操作を利用したプロテインチップ・細胞チップの開発

成功を契機に、



**Figure 1** Schematic representation of the electrochemical bio-lithography using a microdisk electrode. (a) The microelectrode was placed closely above the BSA- or heparin-coated substrate surface, and a potential pulse of 1.7 V vs. Ag/AgCl was applied to generate  $\text{Br}_2$  (subsequently  $\text{HBrO}$ ) in 0.1 M PBS containing 25 mM KBr. The picture shows an experimental view. (b-e) The electrochemically treated surface allows proteins to adsorb, while untreated area retains the blocking effect. (b,c) IgG antibodies can be immobilized with the uniform orientation on the Protein A-preadsorbed substrate. (d,e) The adsorption of ECM proteins such as fibronectin onto the treated area results in localized cell adhesion and growth.

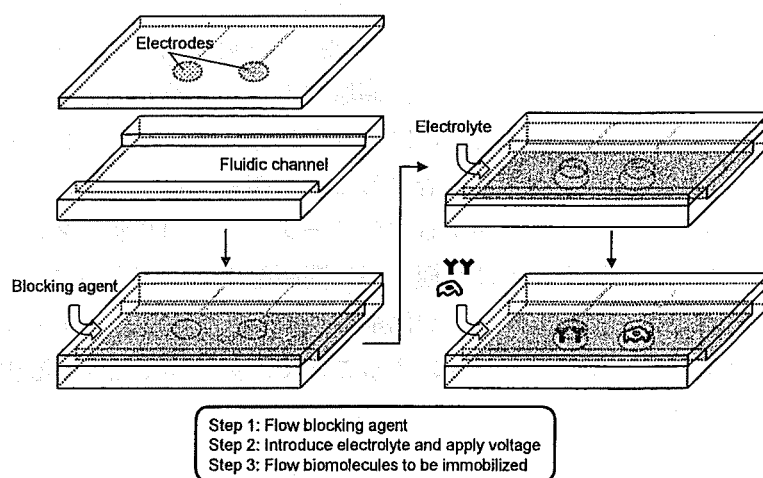
ロテインチップや細胞チップへの注目が高まっている。しかし、上述したように、比較的扱いやすいDNAに比べ、タンパク質や細胞は脆弱であり、また細胞に関してはその挙動を刻々と変化させるため、機能を維持したまま操作することが難しい。本章では、マイルドでウェットなプロセスを用いる電気化学バイオリソグラフィーの特長を生かし、擬似生理環境下における多段階のリソグラフィー処理を検討した。

ウェットな環境下においてリソグラフィー操作を繰り返すことで、一枚の基板上に複数種類のタンパク質から成るマイクロアレイが作製可能であることを実証した。さらに、このプロセスにより試作したマルチ抗体チップを用いて、2種類の血中補体タンパク質の同時検出に成功した。複数種の補体成分の測定値から補体系や免疫系の異常を推定できるため、疾患の予防や術後の経過観察など診断用のバイオチップとしての展開が見込まれる。

また、本プロセスが複数種類の細胞から成るマイクロアレイの構築にも有用であることを示した。さらに、細胞挙動の時空間的制御を可能とする能動的な培養基板の開発に向けて、本技術による細胞運動のナビゲーションを試みた。マイクロ電極で電解生成した酸化剤が細胞に与える影響を検討した上で、本技術による細胞の増殖・遊走の方向性制御が可能であることを実証した。培養環境下で細胞挙動をパターン状に誘導できる本手法は、細胞生物学の研究ツールをはじめとし、細胞の運動性・走化性を指標とするバイオアッセイの簡素化への寄与が期待される。

## 第5章 電気化学バイオリソグラフィー技術のマイクロ流路系への集積化

Micro total analysis systems ( $\mu$ TAS) や Lab-on-a-chip と呼ばれる化学・生化学分析のための操作を全て、数 cm 角のチップ上に集積化する技術の開発は、チップテクノロジーの中で最も重要なイノベーションの一つであり、化学物質や生体分子の混合、反応、分離、精製、検出などのプラットフォームとして盛んに研究され、その有用性が実証されている。チップ上に搭載されるマイクロ流路内は空間が微小であり、比界面積が大きいことや分子拡散距離が短いなどの特徴が挙げられ、これらはバイオアッセイやバイオリアクターの設計・開発においても有利に働く。このような微小空間の特徴を最大限に生かすアプローチの一つに、マイクロ流路内の局所に生体分子を配置・固定することが考えられる。予め生体分子を基板上にパターンニングしておき、後から流路を組み立てる方法も提案できるが、既述した生体分子の脆弱性の観点から言って好ましくない。しかし、流路内などの半閉鎖的な空間に生体分子のパターンニングを達成できるリソグラフィー技術はほとんどない。本論文で開発した電気化学バイオリソグラフィー技術は、マイルドなウェットプロセスを用いる、空間的自由度が大きい、簡易かつ安価な装置を用いるなどの特長を有し、マイクロ流路系との相性が良いといえる。本章では、電気化学バイオリソグラフィー技術の実用化に向けた取り組みの一環として、前章までに蓄積した知見に基づき、本技術のマイクロ流路系への集積化を検討した。



**Figure 2** Strategy for the on-demand and real-time immobilization of biomolecules within a microchannel.

Fig.2 に、本章で採用したストラテジーを示す。まず、電極を流路天井部に組み込んだ一体型流路チップを作製する。次に、流路内にアルブミンやヘパリンなどのブロッキング溶液を流し、流路内壁にブロッキング処理を施す。続いて、臭化物イオンを含む電解液を流路内に充填し、電気化学的なリソグラフィ処理により、流路底壁の生体分子吸着性を局所的に非吸着性から吸着性へと変換する。その後、タンパク質や細胞などを流路内に導入し、そのパターンを完成させる。最大の特徴は、タンパク質や細胞をパターンニングする前に、流路チップのパッケージングをしてしまうことである。

このプロセスにより、必要に応じたタンパク質・細胞の流路内へのパターンニングが可能となり、固定化から測定までの一連の操作をマイルドでウェットな環境下で実施できるオンデマンド型のバイオチップを提唱した。本技術に実質的に必要なものは、電極と乾電池程度の電源であるため、既存のマイクロ流路系への搭載も容易であり、流路ベースのバイオアッセイやバイオリアクター分野への応用展開が期待される。

## 第 6 章 細胞間コミュニケーション活性を指標とするバイオアッセイ系の構築

細胞は生命の最小単位であり、疾病や損傷、治療などに対する生体の反応は個々の細胞応答の集合であるといえる。このため、細胞の挙動や機能を理解することは生命現象を探究する重要なアプローチの一つと考えられ、培養細胞を用いた研究も盛んに行われている。また、動物実験の代替を目的とした培養系における生体材料・化学物質の安全性評価や薬剤スクリーニングも重要な視点である。しかし、現在行われているほとんどの細胞ベースのアッセイは、細胞集団や単一細胞を対象としたものである。実際の生体では多くの疾病が細胞間結合の空間的・生化学的不全に由来することを考慮すると、細胞間結合ひいては細胞ネットワークに対してアッセイを行うべきである。また、食品衛生管理や環境モニタリングをはじめとする健康・環境に関わる新しい計測システムのニーズ急騰や、幹細胞工学の驚異的進展に後押しされ、細胞をセンサ素子とするバイオチップ・デバイスの開発が注目を浴びている。このようなアッセイの高機能化・ハイスループット化を目的としたセンシングデバイスの設計に細胞接着の制御を積極的に取り入れる動きはこれからの展開である。本章では、マイクロパターン培養により構築した細胞ネットワークを用いて、細胞間結合や細胞間コミュニケーションの活性を指標とするバイオアッセイ構築に向けた検討を行った。

単一細胞レベルでパターンニングした微小组織を用いて、通常の培養組織で知られるいくつかの代表的な薬理効果を確認した。さらに、細胞ネットワークのマイクロデバイスへの集積化が、効率的なネットワーク機能応用に有効であることを示した。また、細胞の形状および機能を長期に渡って制御することを念頭に長期安定な表面を模索し、ポリエチレングリコールの化学吸着パターンが、増殖性・移動性に富む細胞においてもパターン培養基板のバックグラウンドとして効果的であることを示した。

## 第 7 章 結論

各章で得られた結果をまとめ、本論文で提案した概念および確立した技術を展望した。

# 論文審査結果の要旨

生体分子と材料表面が接するバイオインターフェースの理解と制御が、バイオテクノロジーの多くの局面で重要となってきた。例えば、生体分子の機能を維持したまま基板表面上に配列固定（パターンニング）する技術は、バイオチップの開発研究におけるキーテクノロジーの一つである。特に、生体分子が乾燥や熱に対して脆弱であることに対応したパターンニング技術の確立が望まれている。

本論文は、生体分子の脆弱性に配慮したパターンニング技術の開発とその応用に関する研究を行い、成果をまとめたものであり、全編 7 章よりなる。

第 1 章は序論で、バイオインターフェース研究におけるリソグラフィー技術の開発動向と問題点を考察し、生体分子の脆弱性に配慮したパターンニング技術の必要性を述べている。

第 2 章では、本論文全般で用いた実験方法について述べている。

第 3 章では、電気化学的手法を用いた擬似生理環境下におけるタンパク質や細胞のパターンニング技術（電気化学バイオリソグラフィー）を提案し実証している。本技術は、アルブミンやヘパリンなどでブロッキング処理を施した基板の生体分子に対する吸着特性が、次亜臭素酸などの酸化剤によって非吸着性から吸着性へと瞬時に変換されるという独自に見出した現象に基づいており、その定量的な解析も行っている。これらは生理的な環境下で行うリソグラフィーの確立であり、これまでにない独創的な成果である。

第 4 章では、マイルドでウェットなプロセスを用いる電気化学バイオリソグラフィー技術の特長を生かした多段階のリソグラフィー操作について述べている。このプロセスにより、複数検体を同時に検出できるマルチ抗体チップの試作に成功している。また、本プロセスが複数種類の細胞から成るマイクロアレイの構築にも有用であることを示している。さらに、細胞挙動の時空間的制御を可能とする能動的な培養基板の開発に向けて、本技術による細胞運動のナビゲーションを実証している。これらは、学術的に重要であるだけでなく、実用上も極めて有用な知見を与えるものである。

第 5 章では、電気化学バイオリソグラフィー技術のマイクロ流路系への集積化について述べている。前章までに蓄積した知見に基づいて、電極を内蔵したマイクロ流路デバイスを試作し、本技術が半閉鎖的空間である流路内へのバイオパターンニングに有用であることを示している。これは実用上極めて有益な成果である。

第 6 章では、マイクロパターン培養により基板上に細胞ネットワークを構築し、細胞間結合や細胞間コミュニケーションの活性を指標とする新規なバイオアッセイ系の検討を行い、その有効性を示している。

第 7 章は結論である。

以上要するに本論文は、擬似生理環境下におけるリソグラフィー技術を独自に開発し、その特長を利用した応用を示したものである。生体分子の脆弱性に配慮した本技術の確立と応用は、これまでにない独創的な成果であり、バイオロボット工学の発展に寄与するところが少なくない。

よって、本論文は博士(工学)の学位論文として合格と認める。